

Korean patent application No. 10-2001-0019100

Title of the Invention: The tripolymer structure of the crystallized humanized apoptosis factor TRAIL protein

Abstract:

The present invention relates to a method for preparing TRAIL protein, a method for crystallizing the protein, and the tripolymer structure of the crystallized TRAIL protein. In particular, according to the present invention, the humanized apoptosis factor (i.e. the TRAIL protein) is largely expressed and purified by using the *E. coli* transformant, and both the TRAIL protein and the tripolymer structure of the TRAIL protein bonded to the hydrosoluble TRAIL are determined by detecting the crystallized protein with the X-ray. Using such tripolymer structure of the TRAIL protein, it is possible to develop the TRAIL protein that is stable or highly active after mutating a specific site from the humanized TRAIL protein that only induces apoptosis of the cancer cells and the virus-infected cells.

BEST AVAILABLE COPY

공개특허10-2001-0019100

(19)대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl. <sup>6</sup>  
C12N 15/12

(11) 공개번호 10-2001-0019100  
(43) 공개일자 2001년03월15일

(21) 출원번호 10-1999-0035354

(22) 출원일자 1999년08월25일

(71) 출원인 동화약품공업 주식회사 황규언  
서울 중구 순화동 5번지

(72) 발명자 임경묵  
서울특별시 노원구 중계동 505 상아아파트 14동 1503호  
차선신  
서울시 은평구 신사1동 6-19  
오병하  
경상북도 포항시 남구 지곡동 16-3교수숙소 E-301  
윤제인  
경기도 안양시 만안구 석수동 423-22  
이경재  
경기도 과천시 별양동 주공아파트 647-306  
김종우  
경기도 안양시 동안구 비산3동 305-85  
윤성준  
서울특별시 관악구 신림5동 1420-11

(74) 대리인 이원희

심사청구 : 없음

(54) 인간 유래 세포소멸인자 T R A I L 의 결정화에 의한 3차원 구조

#### 요약

본 발명은 TRAIL 단백질의 제조 방법; 그 단백질 결정화 방법; 및 결정화된 TRAIL 단백질의 3차원 결합 구조에 관한 것으로, 구체적으로 본 발명에서는 대장균 형질전환체를 이용하여 인간 유래 세포소멸인자인 TRAIL 단백질을 대량발현 및 순수분리하고, 상기 단백질을 결정화시킨 후 엑스선 결정법을 수행하여 TRAIL 단백질 뿐 아니라 TRAIL 수용체와 결합된 형태의 TRAIL 단백질의 3차원 구조를 결정한다. 이와 같은 TRAIL 단백질의 3차 구조를 이용하면, 암세포와 바이러스가 감염된 세포만을 특이적으로 세포고사 시키는 인간 유래의 TRAIL 단백질에서 특정 부위를 돌연변이 시켜 보다 안정된 TRAIL 단백질 또는 활성이 높은 TRAIL 단백질을 개발할 수 있다.

#### 대표도

도5

#### 명세서

#### 도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명의 인간 유래 세포소멸인자 TRAIL 유전자를 포함한 재조합 벡터인 pET3a-TLS에 관한 그림이고,

도 2는 본 발명의 인간 유래 TRAIL의 분자량 확인을 위한 전기영동 결과이고,

도 3은 본 발명의 단백질 결정화된 인간 유래 TRAIL의 사진이고,

도 4는 본 발명의 엑스선 결정법 (x-ray crystallography)에 의한 인간 유래 TRAIL의 3차원 분자구조가 동형삼량체 (homotrimer)를 구성한 형태이고,

도 5는, 본 발명의 인간 유래 TRAIL과 이의 수용체인 DR4 (Death Receptor 4)가 결합된 복합체의 모델이다.

## 발명의 상세한 설명

### 발명의 목적

#### 발명이 속하는 기술 및 그 분야 종래기술

본 발명은 종양괴사인자 중 하나인 인간 유래 TRAIL(TNF Related Apoptosis Inducing Ligand) 단백질의 3차원 구조에 관한 것이다. 보다 상세하게 본 발명은 TRAIL 단백질의 유전자를 포함하는 발현벡터; 상기 발현벡터로 형질전환된 대장균 균주; 상기 균주를 이용한 TRAIL 단백질의 제조 방법; TRAIL 단백질을 결정화하는 방법; 상기 방법에 의해 제조된 단백질 결정; 엑스선 결정법 및 모델링에 의한 TRAIL 및 TRAIL-수용체 결합체의 분자 3차원 구조에 관한 것이다.

세포고사로 알려진 세포예정사 (programmed cell death)는 괴사 (necrosis)로 인한 세포사멸과는 전혀 다른 진행으로 생명체의 분화와 항상성 유지에 중요한 역할을 담당한다 (Itoh, N. et al., Cell 66, 233-243, 1991). 세포고사 과정에는 많은 단백질이 관여하는데 세포밖에 존재하는 리간드 및 이와 결합하는 세포막의 수용체 간의 상호작용이 최초의 세포고사 신호로 작용하며, 세포막 수용체의 세포안 단백질 영역을 통하여 사멸신호를 최종적으로 핵 내의 DNA에 전달하게 된다. 이러한 수용체는 세포안 단백질 영역에 사멸 도메인 (death domain)을 가지고 있어 이들이 직접 아포토시스 경로의 캐스페이즈 기구 (apoptotic caspase machinery)에 작용하게 된다 (Ashkenazi, A. and Dixit V.M., Science 281, 1305-1308, 1998).

세포고사는 면역반응의 최종단계에서 활성화된 임파구의 제거나 바이러스가 감염된 세포 혹은 종양으로 형질 전환된 세포의 제거에 있어서 중요한 역할을 수행한다. 따라서 이러한 세포고사 수용체와 상호작용 하는 세포고사 리간드는 다양한 타입의 암세포의 세포고사를 유도하며, 일반적인 암 치료에 있어서 사용되고 있는 화학요법이나 방사선 치료요법에 있어서 반드시 요구되는 p53 암억제인자에 대한 비의존적인 작용 때문에 강력한 항암 치료제로써의 가능성을 가질 것으로 기대하게 되었다 (Levine A. J., Cell 88, 323-331, 1997).

세포고사 리간드로는 TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , FasL, Apo 3L과 TRAIL등이 알려져 있으며, 이에 대한 수용체로는 TNF- $\alpha$ 와 TNF- $\beta$ 에 결합하는 TNFR-55, TNFR-75가 있고, FasL과 결합하는 Fas, Apo3L과 결합하는 Apo3가 있다. 상기 세포고사 리간드 중에서 최근 발견된 TRAIL은 대부분의 암세포와 몇 종류의 바이러스 감염세포의 세포소멸을 유도하지만 정상세포에는 전혀 영향이 없는 특성을 보였다. 이러한 TRAIL의 수용체로는 DR4 (death receptor 4), DR5, DcR1 (decoy receptor 1), DcR2가 존재함이 확인되었다 (Pan, G. et al., Science 276, 111-113, 1997; Sheridan, J. P. et al., Science 277, 818-821, 1997; Mongkolsapaya, J. et al., J. Immunol. 160, 3-6, 1998). 그러나 TRAIL의 수용체인 DcR1과 DcR2의 경우 다른 수용체와는 달리 신호전달에 요구되는 사멸 도메인이 전혀 없거나, 온전하지 못하여 TRAIL과 결합하더라도 소멸신호를 보내지 못함이 확인되었고 놀랍게도 이 두 수용체는 암세포에서는 발현되지 않고 정상세포에서만 발현되어 정상세포를 TRAIL로부터 보호하는 것으로 알려졌다 (Marsters et al., Curr. Biol. 7, 1003-1006, 1997; Pan et al., Science 277, 815-818 1997).

상기 특성에 의하여 인간 TRAIL의 여러 종류의 암세포에 대한 항암활성을 확인할 수 있었고, 쥐를 이용한 전임상 시험에서도 정상조직은 손상시키지 않고 이식된 암세포의 성장만을 특이적으로 저해함을 확인할 수 있었다 (Walczak et al., Nature medicine 5, 157-163, 1999). 이러한 결과를 토대로 인간 TRAIL을 이용하여 부작용이 없이 여러 종류의 암을 치료하는 항암제를 개발하기 위한 연구가 활발히 진행 중에 있다.

종양괴사인자중 하나인 TRAIL은 그 활성형태가 동형삼량체 (homotrimer)로 순수분리시 비활성형태로의 전환 때문에 안정성에 문제가 있고 따라서 쥐를 이용한 전 임상 시험 등의 연구시 이 문제를 보완하기 위하여 TRAIL 단백질의 N 말단에 류신 지퍼 (leucine zipper) 서열을 첨가하여 안정성을 높이는 시도 등이 있었다 (Walczak et al., 1999). 한편, TRAIL 자체를 쥐와 영장류를 이용한 전임상에 사용한 예도 보고되었는데 이 경우 동물 체중 1 kg 당 TRAIL 10 mg 이상의 다량을 투여하였는데 (Ashkenazi et al., J. Clinic. Invest. 104, 155-162, 1999), 그 이유는 TRAIL의 불안정성에 기인한다고 추정된다. 따라서, TRAIL의 투여량을 줄여서 잠재적인 부작용을 방지하기 위해서는 안정성을 높인 TRAIL 단백질 돌연변이체를 개발하는 것이 중요하며, 이와 같은 돌연변이체 개발은 TRAIL 단백질의 임상적 응용에 있어 결정적 과제로 인식되어 왔다.

생체 고분자들은 작은 기질을 인식하거나 다른 고분자를 인식하여 화학작용 또는 물리적 작용을 통하여 생화학적, 생물학적 기능을 발휘한다. 생체 고분자들은 기질 또는 다른 분자의 인식 부위를 가지고 있으며 이 부위의 3차원 구조를 알면 기능의 저해, 활성화, 또는 변환이 가능하다. 이와 같이 생체 고분자들의 3차원 구조를 밝히면 활성저

해물질, 원하는 기능을 갖는 돌연변이체 창출 등에 유용한 정보를 얻을 수 있으므로, 분자 3차원 구조에 근거하여 신약을 개발하는 노력은 표준적 방법으로 확립되어 있다.

표적 단백질의 분자 3차원 구조를 얻기 위해서는 엑스선 결정법과 핵자기공명 (NMR) 분광학적 방법이 주로 사용되고 있으며, 이와 더불어 기존의 구조를 알고 있는 단백질과의 염기서열 상의 상동성을 비교한 결과를 이용하는 모델링 방법을 이용할 수 있는데, 현재까지 이와 같은 방법으로 분자 3차구조를 밝힌 단백질은 10,300 여개에 달한다. 구조를 이용한 저해제 개발의 대표적 예로는 HIV 단백질분해효소 (protease) 3차원 구조를 근거로 한 AIDS 치료제의 개발, 인플루엔자 바이러스 (influenza virus)의 시알리데이즈 (sialidase) 3차원 구조를 근거로 한 독감 치료제의 개발 (임상 3상) 등을 들 수 있고, 또한 C형 간염바이러스 (HCV)의 단헬리케이스 (helicase)의 경우에는 엑스선 결정학 방법으로 규명한 분자 3차원 구조 자체가 최근 특허로서 공개된 바가 있다. (Kim Joseph L. et al., WO 99/09148, 1999).

안정성이 증대된 인간 유래의 TRAIL 돌연변이체를 얻기 위해서는 TRAIL의 아미노산 서열을 분석하고, 이들 각각에 대한 무작위적인 돌연변이를 통하여 보다 안정화된 돌연변이체를 확인할 수 있다. 그러나 이러한 시도는 방대한 인력과 자원 및 시간을 필요로 할 뿐 아니라, 보다 안정화된 돌연변이체의 성공가능성이 극히 희박하다. 그럼에도 불구하고, 인간 유래 TRAIL의 분자 3차원 구조와 이를 이용한 돌연변이체 연구결과는 아직 알려진 바가 없다.

상기 단점과 한계를 극복하고 보다 안정화된 인간 유래 TRAIL 돌연변이체를 얻기 위하여, 본 발명에서는 인간의 cDNA 라이브러리로부터 분리한 TRAIL 유전자를 대장균에서 대량 발현하고 이를 순수분리하여 단백질 결정화를 한 후 엑스선 결정학 데이터를 얻고, 이 데이터를 이용하여 TRAIL의 분자 3차원 구조를 규명하고 TRAIL과 그 수용체 간의 상호작용에 관여하는 부위를 밝혔다. 본 발명에서 밝힌 TRAIL 분자의 3차원 구조에 기반하면, 공지의 아미노산 변환 방법 등을 통해 TRAIL 단량체 (monomer) 간의 상호작용이 증대되어 안정성이 증대된 돌연변이체 및 TRAIL과 수용체 간의 상호작용이 증대되어 세포사멸 활성도가 증대된 돌연변이체 등을 효과적으로 창출할 수 있다.

#### *발명이 이루고자하는 기술적 과제*

본 발명의 목적은 인간 TRAIL의 분자 3차원 구조를 규명함으로써, 안정성을 개선한 재조합 단백질 및 수용체와의 상호작용을 증대시킨 재조합 단백질을 보다 빠르고 효율적인 방법으로 제조하여 암치료 등에 이용할 수 있도록 하는 것이다.

본 발명의 또다른 목적은 인간 TRAIL을 효과적으로 대장균에서 발현시키고 이를 분리 및 정제함으로써, 인간 TRAIL 단백질을 대량으로 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

#### *발명의 구성 및 작용*

상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 TRAIL 유전자를 포함하는 발현벡터, 이를 포함하는 균주 및 이를 이용하여 TRAIL 단백질을 제조하는 방법을 제공한다.

또한 본 발명은 TRAIL 단백질을 결정화하는 방법 및 이를 이용하여 제조한 단백질 결정을 제공한다.

또한 본 발명은 결정화된 TRAIL 단백질의 3차원 구조 또는 TRAIL 수용체와 결합된 형태의 TRAIL 단백질의 3차원 결합 구조를 제공한다.

이하 본 발명을 상세히 설명한다.

먼저 본 발명은 TRAIL 단백질의 제조 방법을 제공한다.

상기 제조 방법은, 1) 대장균 형질전환체 BL21-TLS(pET3a-TLS)를 배양하는 도중 유도물질인 IPTG를 첨가후 더 배양하는 단계; 2) 상기 균체를 파쇄하여 얻은 불용성 분획을 변성 후 재접힘 (refolding)하여 가용성 단백질을 회수하는 단계; 및 3) 상기 단계 2의 균체 파쇄물의 가용성 분획 및 회수한 가용성 단백질로 양이온 교환 크로마토그래피 및 크기 배제 크로마토그래피를 수행하여 서열 번호 2로 기재되는 TRAIL의 분리 정제를 실시하는 단계로 구성된다.

상기 대장균 형질전환체 BL21-TLS(pET3a-TLS)는 공지의 TRAIL 유전자를 포함하는 재조합 벡터 pET3a-TLS로 형질전환된 균주이다. 즉, 인간 유래 TRAIL 유전자는 281개의 아미노산으로 구성된 폴리펩타이드 (이하, "TRAIL

전구체"라 약칭함)를 암호화하고 있다. 이중 종양괴사인자와의 염기서열을 비교한 결과 세포 밖에서 가공되어 신호로 작용하는 부위가 아미노산 114-281 부위 (서열번호 2로 기재되는 아미노산 서열과 일치함)임이 이미 알려져 있다 (Pitti et al., J. Biol. Chem. 271, 12687-12690, 1996). 따라서 본 발명에서는 아미노산 114-281을 포함한 TRAIL 유전자 단편을 이용하여 상기 재조합 벡터를 제조하였다.

상기 TRAIL 유전자 단편은 포유류의 것을 쓸 수 있으나 인간 유래의 것이 바람직하며, 다양한 대장균 발현 벡터에 삽입할 수 있다. 본 발명의 실시예에서는, 상기 재조합 벡터에 포함된 TRAIL 유전자 단편(서열번호 1 참조)은 인간 유래 태반 cDNA 라이브러리로부터 PCR을 이용하여 획득하였으며, 상기 TRAIL 유전자를 대장균 발현 벡터인 pET3a의 T7 프로모터 하류에 삽입하여 재조합 벡터인 pET3a-TLS를 제조하였다.

상기 제조된 재조합 벡터 pET3a-TLS를 대장균 숙주인 BL21(DE3)에 형질전환하여 형질전환체 BL21-TLS (pET3a-TLS)를 얻었고, 이 형질전환체를 적당한 배지를 이용하여 배양한 후 TRAIL의 대량배양을 유도하였다. 이때, 형질전환체는 OD

$_{600}=0.9$ 인 상태에서 배양한 후 발현 유도물질인 IPTG (isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside)를 첨가하는 것이 바람직하고, 섭씨 22도 내지 37도에서 배양하는 것이 바람직한데 특히 25도에서 배양하는 것이 바람직하다. 상기 대장균 형질전환체 BL21-TLS(pET3a-TLS)는 한국미생물배양센터(KCCM)에 1999년 8월 4일자로 기탁되었다 (수탁번호 KCCM-10169).

본 발명의 다른 실시예에서는 상기 배양된 형질전환체로부터 TRAIL 단백질을 분리, 정제한다. 상기 발현 유도된 형질전환체를 회수하여 초음파 파쇄기를 이용하여 파쇄한 후, 가용성 분획과 불용성 침전물을 분리하였다. 이때, 가용성 분획은 바로 크로마토그래피를 이용하여 TRAIL분리 정제에 이용한 반면, 불용성 분획의 경우 단백질 변성, 재접힘 (refolding), 투석을 거친 후 투석 상등액으로부터 TRAIL 단백질을 크로마토그래피 방법으로 분리정제하였다.

본 발명의 TRAIL의 제조 방법에서, 분리 정제를 위한 크로마토그래피는 양이온 크로마토그래피 및 크기 배제 크로마토그래피를 조합하여 사용할 수 있다. 구체적으로, SP 세파로즈 고속 칼럼 (Pharmacia Biotech)과 같은 양이온 교환 크로마토그래피와 염화나트륨 농도 구배 용액을 이용하여 용출한 후, 각 분획으로 SDS-PAGE를 수행하여 TRAIL이 포함된 분획을 확인한 후 이를 회수한다. 상기 활성 분획을 농축한 후 200 HR 10/30 사이징 칼럼 (Pharmacia Biotech) 등의 크기 배제 칼럼으로 상기 양이온 크로마토그래피와 유사한 방법으로 TRAIL을 정제할 수 있다. 최종 분리된 TRAIL 단백질은 생물학적 활성 검정을 통하여 확인하였다.

상기 TRAIL 단백질의 정제 과정은 기존의 TRAIL 단백질 정제 방법에 비하여 보다 단순화된 정제 공정을 그 특징으로 갖는다. 즉, 본 발명의 TRAIL 단백질 제조 방법 중 크로마토그래피를 이용한 정제 공정은 양이온 크로마토그래피 및 크기 배제 크로마토그래피의 두 단계만으로 구성되기 때문에 기존의 방법에 비해 비용 절감 등의 효과를 가질 수 있다.

상기에서 설명한 바와 같이 본 발명의 TRAIL 단백질 제조 방법에서는, 대장균 내 발현에 적합한 프로모터 등 발현 벡터의 구성성분을 최적화하고; 대장균 균주의 배양 조건 및 발현 유도 조건을 최적화하며; TRAIL 단백질을 가용성 분획과 불용성 분획 양자 모두에서 분리하고; 크로마토그래피에 의한 정제 공정을 단순화함으로써, 배양액 1리터에서 약 20mg의 TRAIL 단백질을 얻는 등 고수율로 TRAIL 단백질을 수득할 수 있었다.

본 발명은 TRAIL 단백질을 결정화 (crystallization)하는 방법 및 이로부터 제조된 TRAIL 단백질 결정을 제공한다.

상기 TRAIL 단백질의 결정화 방법은, 1) 20% 내지 40% PEG MME550 (polyethylene glycol monomethyl ether 550), 0.02M 내지 0.5M 바이신 (Bicine) 및 0.02M 내지 0.5M 염화나트륨이 포함된 용액을 이용하여 단백질을 결정화하는 단계 및

2) 약 24 $\mu$ g의 상기 단백질 시료, 20% 내지 30% PEG MME 550, 10 mM 내지 100 mM 바이신 및 5 mM 내지 20 mM 염화카드뮴을 포함한 동일 부피의 침전용액을 이용하여 보다 큰 단일 결정을 생산하는 단계로 구성된다.

이와 같이 제조된 단백질 결정은 서열번호 2의 아미노산 서열에 의해 기재되며, 공간 그룹이 P6<sub>3</sub>이고, 유니트 셀 디멘션 (unit cell dimension)은 A=B=65.61 Å, C=131.70 Å이며, 비대칭 유니트 안에 TRAIL 단량체 2분자가 포함되어 있는 특징을 가진다.

또한 본 발명은 결정화된 TRAIL 단백질의 3차원 구조 또는 TRAIL 수용체와 결합된 형태의 TRAIL 단백질의 3차원 결합 구조를 제공한다.

상기 TRAIL 단백질의 3차원 구조는 아래와 같은 방법으로 결정된다.



1) TRAIL 단백질 결정의 냉각체 또는 중금속 유도체 결정을 사용하여 TRAIL 결정으로부터 엑스선 데이터를 얻는 단계, 2) 상기 단계에서 얻은 엑스선 데이터로부터 전자밀도를 계산하여 이에 맞는 단백질을 모델링하는 컴퓨터 프로그램 이용하여 TRAIL 단백질의 3차원 구조를 결정하는 단계.

상기 단계 1)의 중금속 유도체는  $K_2PtCl_6$ 와  $K_2HgI_4$  등의 중금속 유도체 결정을 포함하며, 이를 이용하여 엑스선 데이터를 수집하고 전자밀도 지도를 만들기 위한 초기 위상차 정보 계산에 사용하였다.

상기 단계 2)에서 컴퓨터 프로그램은 엑스선 회절 데이터를 토대로 단백질의 3차원 구조를 결정하는 공지의 프로그램을 포함하는데, 상기 프로그램은 분자 대체법 (molecular replacement, MR)과 다중 이질동상 대체법 (multiple isomorphous replacement, MIR) 등을 그 원리로 이용한다. 상기 프로그램의 예로는, CCP4 패키지, 프로그램 O, 프로그램 CHAIN, 프로그램 X-PLOR 등이 있다.

한편, 상기 TRAIL 단백질과 TRAIL 수용체인 DR4가 결합된 형태의 3차원 모델은 하기 방법으로 결정한다.

1) 컴퓨터 프로그램 상에서 TRAIL의 3차원 구조를 TNF- $\beta$ /sTNF-R55 결합체의 3차원 구조와 겹쳐놓는 단계; 2) TRAIL 수용체 DR4의 아미노산 순서에 맞게 sTNF-R55의 아미노산을 치환하는 단계; 3) TRAIL과 모델링된 DR4의 충돌을 제거하기 위해 DR4 아미노산 순서 상의 Glu 56의 골격 비틀림각을 그래픽스 컴퓨터 상에서 조정하는 단계; 및 4) 컴퓨터 프로그램으로 에너지 최소화 (energy minimization)를 수행하는 단계로 구성된다.

상기 단계 1)에서 TNF- $\beta$ /sTNF-R55 결합체의 3차원 구조는 공지의 것 (Banner et al., Cell 73, 431-445, 1993)를 이용할 수 있다.

상기 단계 1)과 3)에서 이용할 수 있는 컴퓨터 프로그램은 QUANTA 등이 있으며, 상기 단계 2)에서 이용할 수 있는 프로그램은 SWISS-MODEL 등이 있으며, 상기 단계 4)에서 이용할 수 있는 컴퓨터 프로그램으로는 X-PLOR 등이 있다.

상기 3차원 구조 또는 3차원 결합 구조는 일반적인 컴퓨터 장치에 저장되고 표시될 수 있다. 상기 컴퓨터 장치에 TRAIL 단백질의 3차원 구조를 표시하기 위해서 다양한 소프트웨어가 사용될 수 있는데, 프로그램 O, 프로그램 CHAIN, 프로그램 QUANTA 등의 소프트웨어가 이에 포함될 수 있다.

본 발명의 구조 분석 결과 규명된 상기 3차원 구조는 전체적으로 베타 스트랜드 ( $\beta$ -strand)와 루프 (loop)만으로 구성된다 (도 4 참조). 특히 서열번호 2로 기재되는 폴리펩타이드의 15번째 내지 48번째 아미노산 잔기 위치에 다른 종류의 TNF 군에 속한 단백질들과는 구별되는 12 내지 16개의 아미노산이 삽입된 형태인 AA"루프가 분자 전체를 휘감는 양상의 독특한 3차원 구조를 취하고 있음을 밝혀내었다.

상기 3차원 구조는 하기 특징적 하부 구조를 포함한다.

1) 스트랜드 (strand) A", A, H, C와 F로 구성되며, 소단위간 접촉에 관여하는 내부 쉬트 (inner sheet); 2) 스트랜드 B', B, G, D와 E로 구성되는 외부 쉬트 (outer sheet); 3) 서열번호 2로 기재되는 폴리펩타이드의 15번째 아미노산부터 48번째 아미노산으로 구성되는 AA" 루프; 4) 서열번호 2로 기재되는 폴리펩타이드의 28번째 아미노산부터 33번째 아미노산으로 구성되는 AA" 루프의 베타-턴 ( $\beta$ -turn) 부위; 5) 서열번호 2로 기재되는 폴리펩타이드의 101번째 아미노산부터 108번째 아미노산으로 구성되는 DE 루프; 6) 서열번호 2로 기재되는 폴리펩타이드의 149번째 아미노산부터 159번째 아미노산으로 구성되는 GH 루프; 7) 인접 아미노산 간의 거리가 5 Å 되는 크기의 공동 (cavity)이 존재하는 TRAIL 단백질의 삼량체 경계면 (trimer interface); 및 8) 상기 AA" 루프, DE 루프 및 GH 루프가 주요한 구성원이 되는 수용체 결합부위.

TRAIL 단량체는 샌드위치를 형성한 두 개의 반평행플릿 베타-쉬트 (anti-parallel-pleated  $\beta$ -sheet)를 중심 골격으로서 포함하고 있고, 인접한 소단위 (subunit)와 전후연결 방식 (head-to-tail fashion)으로 상호작용하여 종 모양의 동형삼량체를 형성한다. TRAIL의 상층 부위는 상당히 유동적인 루프 (아미노산 잔기 80-91와 118-126)로 구성되어 있다. 스트랜드 A", A, H, C와 F는 소단위간 접촉에 관여하는 내부 쉬트를 형성하고, 스트랜드 B', B, G, D와 E는 외부 쉬트를 형성한다. TRAIL의 동형삼량체 구조는 각 소단위의 베타-샌드위치 ( $\beta$ -sandwich)의 한 쪽 끝이 인접한 소단위의 내부 쉬트와 밀접한 상호작용을 하는 형태로 이루어져 있다. TRAIL은 전체 17%에 달하는 방향족 아미노산 잔기를 포함하고 있는데 그 중 8개의 잔기 (His12, Phe50, Tyr70, Tyr72, Tyr76, Tyr130, Phe161, Phe165)가 내부 쉬트의 표면에 존재하여 인접 소단위와의 테두리-정면 간 상호작용 (edge-to-face interaction)을 위한 소수성 플랫폼 (hydrophobic platform)을 제공한다.

TRAIL 구조의 가장 큰 특징은, 비교하는 단백질에 따라 12-16 개 아미노산의 삽입으로 매우 길어진 AA"루프를 형성하는 것이다. 이 AA"루프의 약 절반 정도가 (아미노산 잔기 32-47) 베타-샌드위치의 중간부분 위에 위치하면서 다양한 상호작용에 관여하는데, 구체적으로 Ile13, Leu56, Val145, Val147, Ile153, Met155과 Phe162는 AA"루프의 Ile38과 Trp41와 소수성 상호작용에 관여하고, Glu65와 Tyr100은 각각 AA"루프의 Lys37과 Lys32와

극성 상호작용에 관여하며, 외부 쉬트 표면에 존재하는 4개의 방향족 아미노산 잔기 (Tyr96, Tyr98, Tyr100, Phe144)는 AA" 루프의 Lys32, Ala33, Leu34, Gly35, Lys37과 상호작용하고 있다. TRAIL의 수용체 결합 부위는 인접한 소단위 간의 세 개의 동일한 틈새 (cleft)로서, 이 소단위간 틈새 (intersubunits cleft)를 명확히 확인할 수 있었다. 비 범상적으로 길어진 AA"루프는 TRAIL 단량체를 가로질러 인접한 수용체 결합 부위까지 이르러서 이 부위의 구조적 정전기적 특성에 상당한 영향을 미치고 있음이 확인되었다. 특히 수용체 결합 부위의 일부를 구성하는 AA"루프의 베타-턴 부위는 모두 극성을 지니는 아미노산 (Lys 29, Asn 30, Glu 31, Lys 32)으로 구성되어 있다.

TNF군의 단백질들의 수용체 결합부위는 인접한 소단위 사이의 세 개의 소단위간 틈새임이 돌연변이 연구 (Van Ostade et al., Protein Eng. 7, 5-22, 1994)와 구조연구 (Banner et al., Cell 73, 431-445, 1993)를 통하여 알려져 있다. TRAIL 분자의 3차원 구조상에서 비범상적으로 긴 AA"루프는 단량체를 가로질러 이 루프 중 29-32번째 아미노산들이 인접한 소단위간 틈새의 일부를 구성하고 있어 수용체 인지에 중요한 역할을 할 것으로 생각되었다. 규명된 TRAIL 분자의 3차원구조를 바탕으로 아미노산 순서의 비교와 기존에 알려진 TNF-β와 수용체의 구조 (Banner et al., 1993)를 근거로 TRAIL과 TRAIL 수용체의 하나인 DR4의 결합체 구조를 모델링하였다. 그 결과 TRAIL의 AA"루프 뿐만 아니라, DE 루프와 GH 루프도 DR4와 뚜렷하게 상호작용 함을 확인하였다.

본 발명은 상기 3차원 구조를 이용하여 TRAIL 단백질의 안정성 또는 활성을 증진시킨 재조합 단백질을 제조하는 방법을 제공한다.

본 발명의 구조 분석 결과 규명된 상기 3차원 구조 및 공지의 돌연변이 단백질을 제조법을 이용하면, 천연형보다 안정하거나 활성이 높은 재조합 단백질을 용이하게 제조할 수 있다.

구체적으로, TRAIL의 활성화는 TRAIL의 삼량체 구조가 필수이며 이 구조를 이루는 힘은 삼량체 경계면 (trimer interface) 간에 그리고 이량체 경계면 간에 위치한 아미노산들 사이의 다양한 상호작용들이다. 단백질 내의 공동 (cavity)의 존재와 그 크기가 단백질의 안정성과 밀접한 관계가 있으며 그 공동을 채워줌으로써 안정성을 높일 수 있음이 이미 알려져 있다 (Vlassi et al., J. Mol. Biol. 285, 817-827, 1999; Takano, K. et al., K. Mol. Biol., 254, 62-76, 1995; Erikson, A. E. et al., Science 255, 178-183, 1992). 그런데, 본 발명에 따르면 TRAIL의 삼량체 경계면에는 특징적인 공동이 존재하며, 가장 큰 공동의 주변을 이루는 아미노산간의 거리가 5 Å임을 확인할 수 있었다. 따라서, 본 발명의 TRAIL 3차원 구조에서 밝혀진 삼량체 경계면의 특징적 공동을 이용하여 삼량체 경계면 부위의 돌연변이를 특이적으로 수행할 수 있다.

뿐만 아니라, 종양괴사인자의 수용체 결합부위에 있는 아미노산의 치환으로 수용체와의 결합력을 바꾼 돌연변이 종양괴사인자의 생산은 이미 상당히 알려져 있다 (Cha et al., J. Biol. Chem. 273, 2153-2160, 1998). 따라서 TRAIL의 구조를 규명하고 TRAIL/sDR4의 모델링으로 밝혀진 수용체 결합 부위의 주요 아미노산을 밝히면, TRAIL과 이의 수용체 간의 결합력이 변환된 돌연변이체를 용이하게 제조할 수 있게 된다.

상기와 같은 돌연변이체 단백질에서 변형시킬 수 있는 유용한 아미노산 잔기로는, 1) 스트랜드 A", A, H, C와 F 등 내부 쉬트에 해당하는 아미노산 잔기; 2) 삼량체 경계면 또는 이량체 경계면 (dimer interface)에 해당하는 아미노산 잔기; 및 3) AA" 루프, AA" 루프의 베타-턴, DE 루프 또는 GH 루프에 해당되는 아미노산 잔기 등이 있다.

TRAIL 단백질의 안정성을 증진시키기 위해서, 상기 내부 쉬트 또는 삼량체 경계면 또는 이량체 경계면을 변형하여 삼량체의 형성을 증진시키고자 할 때에는, 1) 상기 내부 쉬트의 해당 아미노산을 변형하되, 다양한 아미노산 사이의 상호작용을 증대시키는 방향, 금속이온의 결합부위 또는 이황화결합을 생성시키는 방향 등으로 변형할 수 있고, 2) 상기 삼량체 경계면 또는 이량체 경계면의 해당 아미노산을 변형하되, 다양한 아미노산 사이의 상호작용을 증대시키는 방향, 금속이온의 결합부위 또는 이황화결합을 생성시키는 방향, 공동을 채우는 방향 등으로 변형할 수 있다.

또한, TRAIL 단백질의 활성을 증진시키기 위해 TRAIL 수용체 결합 부위를 조작하고자 할 때에는, 상기 AA" 루프, AA" 루프의 베타-턴, DE 루프 또는 GH 루프에 해당되는 아미노산 잔기를 변형하되, 다양한 아미노산 사이의 상호작용을 증대시키는 방향, 금속이온의 결합부위 또는 이황화결합을 생성시키는 방향 등으로 변형시킬 수 있다.

본 발명에서 상기 아미노산 잔기들의 돌연변이는 하나 이상의 아미노산의 치환, 삽입 또는 결실을 수행하는 것으로 구성된다.

이하 본 발명을 실시예에 의하여 설명한다.

단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<실시예 1> 인간 유래 TRAIL의 클로닝 및 대량 발현인간 유래 TRAIL의 전구체 중 아미노산 잔기 114번째 위치에서 281번째 위치를 암호화한 DNA 단편을 λ gt11 인간 유래 태반 cDNA 라이브러리 (Clontech catalog 참조)로

부터 PCR 반응을 이용하여 획득하였다. 이때 PCR에 사용되는 프라이머 쌍으로는 서열번호 3 및 서열번호 4로 기재되는 합성 올리고뉴클레오타이드를 사용하였다. 획득된 DNA 단편을 대장균 발현 벡터인 pET-3a(Novagen사)의 T7 프로모터의 하류에 삽입하여 도 1과 같은 재조합벡터 pET3a-TLS를 제조하였다. 이렇게 제조된 재조합 벡터 pET3a-TLS를 대장균 BL21(DE3)에 Maniatis 등의 방법(Molecular cloning, CHS press, 1989)으로 형질전환하여 형질전환체 BL21-TLS(pET3a-TLS)를 획득하였고 이들의 벡터를 분리하여 제한효소지도를 확인함으로써 형질전환여부를 확인하였다. 이렇게 획득된 BL21-TLS(pET3a-TLS)를 TRAIL 대량 발현 조건 확립에 사용하였다.

상기 형질전환체를 암피실린이 0.1 mg/ml의 농도로 포함된 LB 배지에서 섭씨 37도에서 배양하고 OD

$_{600}$ 을 측정하여 다양한 농도의 균체를 획득한 후, 이들 각각을 일정한 농도의 IPTG (isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside)를 첨가하여 대량발현을 유도한 후 일정 시간동안 발현을 유도하고 발현된 TRAIL을 정량하였다. 형질전환체를 OD

$_{600} = 0.9$  정도가 되도록 배양한 다음 IPTG를 1mM 농도로 첨가하여 섭씨 25도 또는 37도에서 4시간 동안 계속 배양하여 배양액 1리터에서 약 20mg의 수율로 TRAIL을 획득할 수 있었으며, 특히 섭씨 25도에서 배양하면 TRAIL이 용해성으로 많이 발현됨을 확인하였다.

상기 대장균 형질전환체 BL21-TLS(pET3a-TLS)는 한국미생물배양센터(KCCM)에 1999년 8월 4일자로 기탁되었다 (수탁번호 KCCM-10169).

<실시에 2> 인간 유래 TRAIL의 분리 정제대량 발현이 유도된 형질전환체 BL21-TLS(pET3a-TLS) 균체를 회수하고 초음파 파쇄기를 이용하여 파쇄하였다. 그리고 가용성 분획과 불용성 분획을 분리하고 가용성 분획은 바로 단백질 분리를 위한 분리정제에 이용하였다. 불용성 분획의 경우는 우선 TRAIL이 포함된 봉입체 (inclusion body)를 원심 분리하여 회수한 다음 20mM 인산나트륨 (pH 7.6), 6M 구아니딘 염산과 1mM DTT (dithiothreitol)를 포함한 완충액 1을 이용하여 변성화시킨다. 변성된 단백질은 바로 20mM 인산나트륨 (pH 7.6), 1mM DTT (dithiothreitol)를 포함한 완충액 2의 10배 희석액을 이용하여 재접힘 (refolding)시키고 동일한 새로운 완충액 2 희석액으로 섭씨 4도에서 밤샘 투석시켰다. 투석하는 동안 형성된 침전물을 제거한 후 상등액을 가용성 분획과 같은 방법으로 분리정제용 크로마토그래피를 이용하여 TRAIL의 분리정제를 수행한다. 이때 사용한 크로마토그래피는 일차적으로 양이온 교환 수지를 이용하였으며, 구체적으로는 SP 세파로즈 고속 칼럼 (Pharmacia Biotech)을 이용하여 TRAIL이 포함된 상기 분획을 컬럼에 넣고, 충분히 씻어준 후 0.0 M 내지 1.0M NaCl 농도구배 용액을 이용하여 NaCl의 농도가 점차 증가되어 포함된 완충액 2를 컬럼에 흘려 주었다. 이때 용출된 각 분획을 회수하여 SDS-PAGE를 통하여 TRAIL의 포함여부를 확인하였다. TRAIL이 포함된 것으로 확인된 분획은 10 mg/ml의 농도로 농축하였으며, 농축된 분획을 크기 배제 칼럼 크로마토그래피 (200 HR 10/30 sizing column, Pharmacia Biotech)에 넣고 완충액 2를 사용하여 용출한 후 각 분획을 SDS-PAGE를 통하여 확인하였다. TRAIL이 포함된 분획을 10 mM HEPES (pH 7.6), 1mM DTT, 0.3M 염화나트륨이 포함된 완충액을 이용하여 투석한 후, 12 mg/ml의 농도로 농축하여 결정화에 이용하였다. 이와 같은 조건으로 단백질 분리정제를 실시하여 도 2에서와 같이 순수한 TRAIL가 분리정제 되었음을 확인할 수 있었다.

<실시에 3> 인간 유래 TRAIL의 생물학적 활성검정상기 실시예에서 제조된 TRAIL 단백질을 이용하여 세포고사 활성도를 확인하였다. 본 발명에서 TRAIL의 생물학적 활동도는 악티노마이신 D가 처리된 저켓 T 세포를 사용하여 세포독성을 확인함으로써 수행하였다 (Creasey et al., Cancer Res. 47; 145-149, 1987).

구체적으로, 활성도를 측정하기 바로 전에 저켓 T세포를  $5 \times 10^4$  cell/well 농도로 96웰 플레이트에 담긴 RPMI 1640 배지 (10% 태아 혈청과 0.5  $\mu$ g/ml 악티노마이신 D 함유)에 분주한다. TRAIL을 여러 농도로 첨가한 후 5% CO

$_2$ 를 포함하고 습기를 함유한 공기조건에서 섭씨 37도에서 20시간 배양한다. 세포의 생존도는 세포의 대사활동도를 측정하며 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxy phenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium bromide 분석 방법을 제조자의 지시(Promega Technical Bulletin No. 169, CellTiter 96TM AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay)대로 수행하였다.

또한 TRAIL의 세포고사 유도 여부는 앞서의 저켓 T세포를 동일한 방법으로 배양하고, 이들에게 활성을 확인할 시료를 동일하게 처리한 후 20시간후 배양된 세포를 포함한 배양액으로부터 DNA를 회수하여 아가로스겔 전기영동을 수행한 후 전기영동한 겔상에서의 세포고사의 특징중 하나인 DNA 래더링 (DNA laddering) 형성여부를 확인함으로써 실시하였다.

<실시에 4> 인간 유래 TRAIL의 결정화TRAIL의 결정은 섭씨 4도에서 24웰 린브로 플레이트 (24-well Linbro plate)를 사용한 행잉드롭 증기분산법 (hanging-drop vapour-diffusion method)에 의하여 얻었다. 초기 결정화 스크리닝은 스파즈 매트릭스 스크리닝 키트 (sparse-matrix screening kit, Hampton Research, USA)인 Crystal Screen 2



TM으로 이행하였다. 작은 육각형 평면형 결정 (hexagonal plate crystal)이 30% PEG MME550 (polyethylene glycol monomethyl ether 550), 0.1M 바이신 (pH9.0) 및 0.1M 염화나트륨이 포함된 용액에서 하루만에 생성되었다. 이어서 초기 결정화 조건을 최적화하는 과정에서 2 $\mu$ l 단백질 시료 (12 mg/ml)를 동일한 부피의 25% PEG MME 550, 0.05M 바이신 (pH 9.0) 및 10 mM 염화카드뮴을 포함한 침전용액을 섞은 혼합액으로부터 보다 큰 (0.2 x 0.2 x 0.1 mm) 단일 결정이 생성되는 것을 확인하였다. 결정화 혼합액은 섭씨 4도에서 1 ml의 동일한 침전용액과 평형상태에 이르게 하였고 결정은 2주 정도에 최대크기로 성장하였다. 이렇게 얻어진 TRAIL의 결정이 도 3에 나타나 있다.

<실시예 5> 엑스선 데이터 수집, 분자 3차원 구조 모델링과 구조의 개선상기 TRAIL 결정으로부터 엑스선 데이터를 얻기 위하여 우선 동일한 침전용액에 10% MPD를 포함한 냉동보호제 (cryoprotectant) 용액에 결정을 잠시 담근 후 냉각기 (cryostream cooler, Oxford Cryosystems UK)를 이용하여 100. K의 질소 가스로 순간 냉각시켰다. 이렇게 냉각된 TRAIL의 결정 또는 TRAIL의 중금속 유도체 결정을 사용하여 냉각된 상태에서 엑스선 발생장치 (MAC Science M18XHF)에서 나오는 CuK $\alpha$  선(파장 1.5418 Å)을 사용하여 DIP2020 영상플레이트 시스템 (DIP2020 imaging-plate system)에 엑스선 회절 데이터를 수집하거나 BL18B 빔라인 (BL18B beamline, 일본 Photon Factory)에서 나오는 엑스선 (파장 1.00 Å)을 사용하여 data를 수집하였다.

이와 같이 수집된 자료를 토대로 인간 TRAIL의 3차원 구조는 분자 대체법 (molecular replacement, MR)과 다중 이질동상 대체법 (multiple isomorphous replacement, MIR)을 조합하여 규명하였다. 이때 MR 방법에는 TNF- $\alpha$  돌연변이의 3차원 구조를 모델로 사용하였고 (Cha et al., 1998), MIR 방법에는 K

$_2$ PtCl $_6$ 와 K $_2$ HgI $_4$  각각의 중금속 유도체 결정을 얻어 엑스선 회절 데이터를 수집하고 전자밀도 지도를 만들기 위한 초기 위상차 정보 계산에 사용하였다. 이 과정에 필요한 소프트웨어는 CCP4 패키지 (CCP4 Collaborative Computational Project Number 4., Acta Cryst. D50, 70-763, 1994)를 사용하였고 프로그램 O (Jones, T. A., Kjeldgaard, M. O., version 5.9, Uppsala, Sweden, Uppsala University, 1993) 및 프로그램 CHAIN을 이용하여 전자밀도에 맞게 단백질의 모델을 만들었고, 프로그램 X-PLOR (Brunger, A. T., X-PLOR Version 3.0, New Haven, CT.: Yale University Press, 1992)를 이용하여 구조를 정비하였다. 최종적으로 확립된 구조는 결정학적 R 인자가 20.9%, R-free가 28.2%이며, Rmsd 결합 길이는 0.008, Rmsd 결합각 1.662°임을 보였다.

도 4는 상기 규명된 TRAIL의 구조를 보여주는데, 전자밀도가 보이지 않는 아미노산 1-8, 80-91 및 118-126 부위와 전자밀도가 매우 미약한 아미노산 17-19, 24-27 및 44-45 부위는 생략되었는데, 이 부위는 상당한 구조적 유연성을 가지며 유동적인 구조를 보이는 부위로 TRAIL의 구조유지 및 생물학적 활성과 전혀 무관한 부위이다.

TRAIL은 여타의 TNF 군의 단백질들과 염기서열을 비교한 결과 상당히 낮은 동질성을 보이고 있지만, 분자 구조가 알려진 TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$  및 CD40L 과 비교할 때 3차원 구조 및 4차원 구조상 상당한 유사성을 보인다.

구체적으로, 다른 세 구조와 유사하게 TRAIL 단량체는 샌드위치를 형성한 두 개의 반평행플릿 베타-시트를 중심 골격으로서 포함하고 있고, 인접한 소단위와 전후연결 방식으로 상호작용하여 종 모양의 동형삼량체를 형성한다. TRAIL의 상층 부위는 상당히 유동적인 루프 (아미노산 잔기 80-91와 118-126)로 구성되어 있다. 스트랜드 A", A, H, C와 F는 소단위간 접촉에 관여하는 내부 시트를 형성하고, 스트랜드 B', B, G, D와 E는 외부 시트를 형성한다. TRAIL의 동형삼량체 구조는 각 소단위의 베타-샌드위치 ( $\beta$ -sandwich)의 한쪽 끝이 인접한 소단위의 내부 시트와 밀접한 상호작용을 하는 형태로 이루어져 있다. TRAIL은 전체 17%에 달하는 방향족 아미노산 잔기를 포함하고 있는데 그 중 8개의 잔기 (His12, Phe50, Tyr70, Tyr72, Tyr76, Tyr130, Phe161, Phe165)가 내부 시트의 표면에 존재하여 인접 소단위와의 테두리-정면 간 상호작용을 위한 소수성 플랫폼을 제공한다.

TRAIL 구조의 가장 큰 특징은, 비교하는 단백질에 따라 12-16 개 아미노산의 삽입으로 매우 길어진 AA"루프를 형성하는 것이다. 이 AA"루프의 약 절반 정도가 (아미노산 잔기 32-47) 베타-샌드위치의 중간 부분 위에 위치하면서 다양한 상호작용에 관여하는데, 구체적으로 Ile13, Leu56, Val145, Val147, Ile153, Met155과 Phe162는 AA"루프의 Ile38과 Trp41와 소수성 상호작용에 관여하고, Glu65과 Tyr100은 각각 AA"루프의 Lys37과 Lys32와 극성 상호작용에 관여하며, 외부 시트 표면에 존재하는 4개의 방향족 아미노산 잔기 (Tyr96, Tyr98, Tyr100, Phe144)는 AA" 루프의 Lys32, Ala33, Leu34, Gly35, Lys37과 상호작용하고 있다. TRAIL의 수용체 결합 부위는 인접한 소단위 사이의 세 개의 동일한 틈새로서, 이 소단위간의 틈새를 명확히 확인할 수 있었다. 비 범상적으로 길어진 AA"루프는 TRAIL 단량체를 가로질러 인접한 수용체 결합 부위까지 이르러서 이 부위의 구조적 정전기적 특성에 상당한 영향을 미치고 있음이 확인되었다. 특히 수용체 결합 부위의 일부를 구성하는 AA"루프의 베타-턴 부위는 모두 극성을 지니는 아미노산 (Lys 29, Asn 30, Glu 31, Lys 32)으로 구성되어 있다.

<실시예 6> TRAIL과 수용체인 DR4의 결합구조TNF 수용체 단백질인 TNF-R55의 세포외 부위 (sTNF-R55)는 TRAIL 수용체 단백질들 특히 DR4의 세포외 부위 (sDR4)와 아미노산 염기서열에서 상당한 상동성을 보이며, 특히 이 단백질 군에 특징적인 시스테인 리치 도메인 (CRDs)을 나타내는 시스테인 잔기들이 잘 보존되어 있다. 따라서 아미노산 서열의 비교와 기존에 알려진 TNF- $\beta$ /sTNF-R55 결합체간의 구조(Banner et al., 1993)를 근거로

TRAIL/sDR4 결합체의 구조를 모델링 하였다. sDR4의 초기모델은 상대적 단백질 모델링 프로그램인 SWISS-MODEL (Peitsch, Biochem. Soc. Trans. 24, 274-279, 1996)을 사용하여 얻었는데 이 모델과 TRAIL의 구조를 TNF- $\beta$ /sTNF-R55 결합체 구조와 겹쳐보면 TRAIL의 AA"루프의  $\beta$ -턴 부위와 충돌함을 알 수 있었다. 그러나 이 충돌은 sDR4의 두 번째 CRD의 모듈 (아미노산 57-71)을 Gln56을 중심으로 단백질 골격의 비틀림각 (torsion angle)을 바꾸어서 움직이면 대부분 제거됨을 알 수 있었다. Gln56 위치는 상당히 유동적으로 변하는 부위로 이미 알려져 있다 [Naismith, et al., Structure 4, 1251-1262, 1996).

상기 모델을 전체적으로 약간 돌려서 다른 구조적 충돌을 없애고 프로그램 X-PLOR (Brunger, 1992)를 사용하여 에너지 최소화 작업을 행하였다. 얻어진 sDR4 모델은 구조적, 정전기적으로 TRAIL 구조와 매우 상보적이며 TRAIL의 AA"루프 (아미노산 잔기 15-48), DE 루프 (아미노산 잔기 101-108), 그리고 GH 루프 (아미노산 잔기 149-159)와 특히 뚜렷한 상호작용을 보이며, 아미노산 잔기 78-80, 89-90, 92, 113, 115, 124-126, 146, 148 과도 상호작용함을 확인하였다. 이들 세 개의 루프는 TNF와 TNF 수용체 사이에서도 서로 간의 인지에 중요한 역할을 하는 것이 이미 돌연변이 연구 (Van Ostade et al., 1994)와 구조 연구 (Banner et al., 1993)를 통하여 밝혀져 있다.

TNF의 수용체 결합부위에 있는 아미노산의 치환으로 수용체와의 결합력을 바꾼 돌연변이 TNF는 많이 보고되었기 때문에 (Cha et al., 1998), 이와 유사한 방법으로 TRAIL과 TRAIL 수용체들간의 결합력을 조절할 수 있다. 따라서 본 발명의 TRAIL의 분자 3차원 구조와 TRAIL/sDR4 결합 구조의 모델링으로 밝혀진 수용체 결합부위에 해당하는 아미노산 잔기는 TRAIL과 그 수용체간의 결합력이 변환된 돌연변이체 제조에 중요한 정보를 제공한다.

### 발명의 효과

상기와 같이 밝혀진 TRAIL 단백질의 3차원 구조 또는 TRAIL 단백질과 그 수용체 간의 3차원 결합 구조를 이용하면, 삼량체 또는 이량체 경계면 또는 수용체 결합 부위에 해당하는 아미노산 잔기에 돌연변이를 일으킴으로써 TRAIL 단백질의 안정성 또는 활성을 증가시킨 재조합 단백질을 제조할 수 있으므로, 본 발명의 TRAIL 단백질의 3차원 구조 또는 TRAIL 단백질과 그 수용체 간의 3차원 결합 구조는 새로운 항암제 등의 개발에 유용할 뿐만 아니라 적은 투여량으로 높은 생체내 효능을 보이는 재조합 TRAIL 단백질의 개발에도 유용하다.

### (57)청구의 범위

#### 청구항1

서열번호 2로 기재되는 인간 유래 TRAIL 단백질을 암호화하는 유전자를 포함한 대장균용 발현벡터 pET3a-TLS.

#### 청구항2

제 1항의 발현벡터를 포함하는 대장균 (E. coli) 형질전환체 BL21-TLS(pET3a-TLS) (수탁번호 KCCM-10169).

#### 청구항3

1) 제 2항의 대장균 균주를 섭씨 22도 내지 37도에서 배양하면서 배양액에 IPTG를 첨가하여 TRIAL 유전자를 발현시키는 단계; 2) 상기 균체를 파쇄하여 얻은 불용성 분획을 변성 후 재접힘 (refolding)하여 가용성 단백질을 회수하는 단계; 및 3) 상기 단계 2의 균체 파쇄물의 가용성 분획 및 회수한 가용성 단백질로 양이온 교환 크로마토그래피 및 크기 배제 크로마토그래피를 수행하여 서열 번호 2로 기재되는 TRAIL의 분리 정제를 실시하는 단계;로 구성되는 재조합 벡터 pET3a-TLS를 포함한 대장균 형질전환체 BL21-TLS(pET3a-TLS)를 이용한 TRAIL의 제조 방법.

#### 청구항4

1) 20% 내지 40% PEG MME550 (polyethylene glycol monomethyl ether 550), 0.02M 내지 0.5M 바이신 (Bicine) 및 0.02M 내지 0.5M 염화나트륨이 포함된 용액을 이용하여 단백질을 결정화하는 단계 및

2) 약 24 $\mu$ g의 상기 단백질 시료, 20% 내지 30% PEG MME 550, 10 mM 내지 100 mM 바이신 및 5 mM 내지 20 mM 염화카드뮴을 포함한 동일 부피의 침전용액을 이용하여 보다 큰 단일 결정을 생산하는 단계로 구성되는 서열 번호 2로 기재되는 TRAIL 단백질을 결정화하는 방법.

#### 청구항5

제 4항의 방법에 의해 제조되었으며, 공간 그룹이 P6<sub>3</sub>이고, 유니트 셀 디멘션 (unit cell dimension)은 A=B=65.61 Å, C=131.70 Å이며, 비대칭 유니트 안에 TRAIL 단량체 2분자가 포함되어 있는 TRAIL 단백질 결정.

**청구항6**

소단위간 접촉에 관여하고 스트랜드 (strand) A, A", H, C 및 H로 구성되는 내부 쉬트 (inner sheet); 스트랜드 B', B, G, D와 E로 구성되는 외부 쉬트 (outer sheet); 및 상기 10개의 스트랜드를 연결하는 루프 (loop)로 구성되는 서열번호 2의 TRAIL 단백질 3차원 구조.

**청구항7**

제 6항에 있어서, 상기 내부 쉬트는 그 표면에 8개의 잔기 (His12, Phe50, Tyr70, Tyr72, Tyr76, Tyr130, Phe161, Phe165)가 존재하여 인접 소단위 (subunit)와의 테두리-정면 간 상호작용 (edge-to-face interaction)을 위한 소수성 플랫폼 (hydrophobic platform)을 구성하는 것을 특징으로 하는 TRAIL 단백질의 3차원 구조.

**청구항8**

제 6항에 있어서, 인접한 소단위와 전후연결 방식 (head-to-tail fashion)으로 상호작용을 하여 종 모양의 동형삼량체 (homotrimer)를 형성하고, 각 소단위의 베타-샌드위치 ( $\beta$ -sandwich)의 한쪽 끝이 인접한 소단위의 내부 쉬트와 밀접한 상호작용을 하는 형태로 이루어진 것을 특징으로 하는 TRAIL 단백질의 3차원 구조.

**청구항9**

제 6항에 있어서 인접 아미노산 간의 거리가 약 5 Å 크기의 공동 (cavity)이 존재하는 TRAIL의 삼량체 경계면 (trimer interface)을 포함하는 것을 특징으로 하는 TRAIL 단백질의 3차원 구조.

**청구항10**

제 6항에 있어서, 상기 스트랜드 A 및 A" 사이에 포함되는 AA"루프는 아미노산 잔기 34개로 구성되고 분자 전체를 휘감고 있는 형태인 것을 특징으로 하는 TRAIL 단백질의 3차원 구조.

**청구항11**

제 10항에 있어서, 상기 AA" 루프 중 Ile38과 Trp41는 Ile13, Leu56, Val145, Val147, Ile153, Met155과 Phe162와의 소수성 상호작용에 관여하고, AA"루프의 Lys37과 Lys32는 Glu65과 Tyr100와의 극성 상호작용에 관여하며, AA" 루프의 Lys32, Ala33, Leu34, Gly35, Lys37은 외부 쉬트 표면에 존재하는 4개의 방향족 아미노산 잔기 (Tyr96, Tyr98, Tyr100, Phe144)와 상호작용을 하는 것을 특징으로 하는 TRAIL 단백질의 3차원 구조.

**청구항12**

제 6항에 있어서, AA"루프, DE 루프 및 GH 루프가 수용체 DR4와 상호작용을 하는 것을 특징으로 하는 TRAIL 단백질의 3차원 구조.

**청구항13**

제 12항에 있어서, TRAIL 단백질의 15번째 아미노산부터 48번째 아미노산으로 구성되고 수용체인 DR4와 상호작용을 하는 AA" 루프; 28번째 아미노산부터 33번째 아미노산으로 구성되고 수용체 결합부위에 포함되는 AA" 루프의 베타-턴 ( $\beta$ -turn) 부위; 101번째 아미노산부터 108번째 아미노산으로 구성되고 수용체인 DR4와 상호작용을 하는 DE 루프; 및 149번째 아미노산부터 159번째 아미노산으로 구성되고 수용체인 DR4와 상호작용을 하는 GH 루프를 포함하는 것을 특징으로 하는 TRAIL 단백질의 3차원 구조.

**청구항14**

제 12항에 있어서, 상기 AA"루프, DE 루프 및 GH 루프, 아미노산 잔기 78-80, 89-90, 92, 113, 115, 124-126, 146, 148가 DR4와 상호작용을 하는 것을 특징으로 하는 TRAIL 단백질의 3차원 구조.

**청구항15**

제 6항의 3차원 구조를 이용하여 내부 쉬트(inner sheet), 삼량체 또는 이량체 경계면 및 수용체 결합 부위로 구성되는 그룹으로부터 1종이상 선택된 것에 해당하는 아미노산 잔기에 돌연변이를 일으킴으로써 TRAIL 단백질의 안정성 또는 활성을 증진시킨 재조합 단백질을 제조하는 방법.

**청구항16**

제 15항에 있어서, 내부 쉬트 (inner sheet)에 해당하는 아미노산 잔기는 스트랜드 A", A, H, C 또는 F에 해당하는

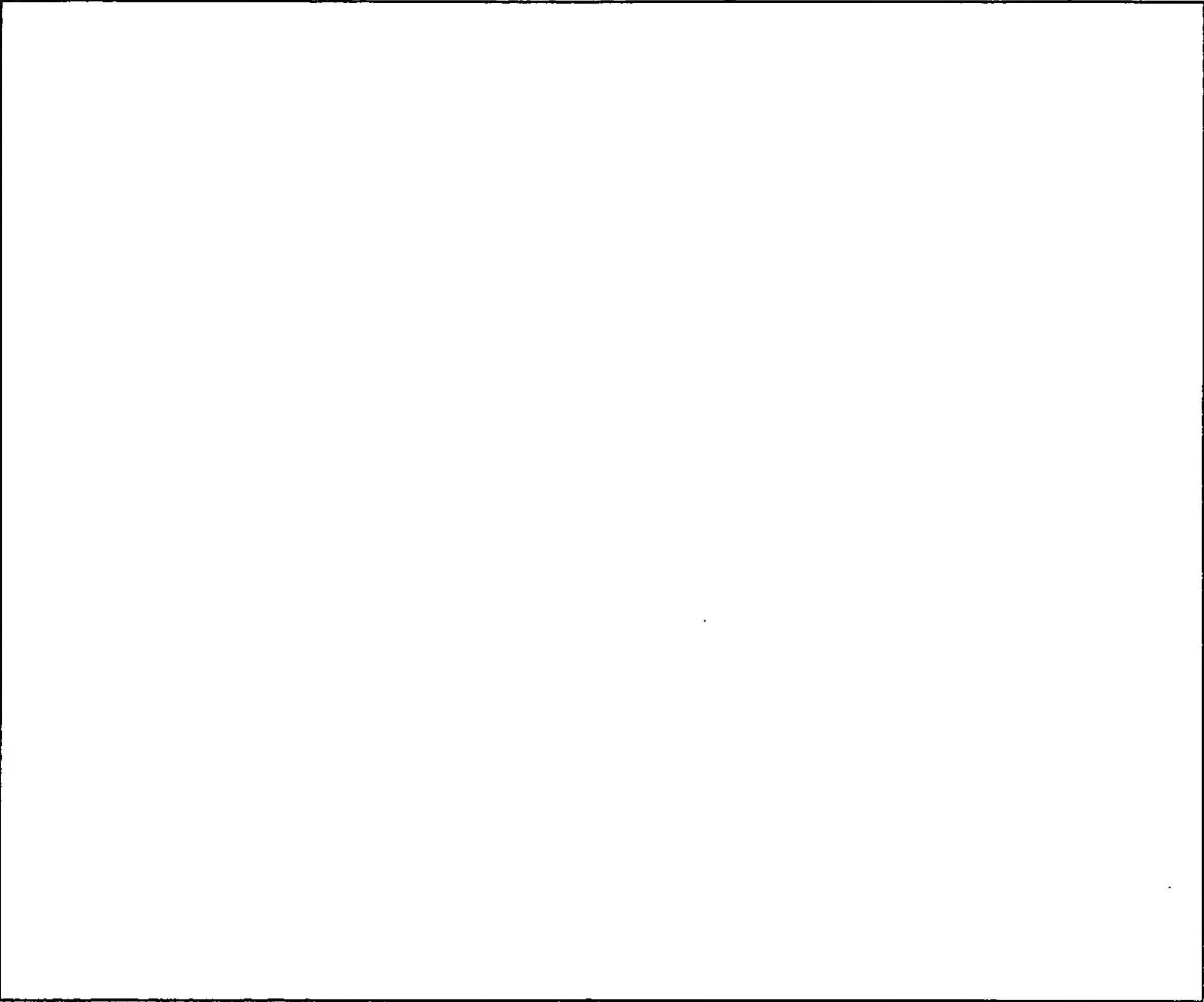
아미노산 잔기인 것을 특징으로 하는 재조합 단백질을 제조하는 방법.

청구항17

제 15항에 있어서, 상기 수용체 결합 부위에 해당하는 아미노산은 AA" 루프, AA" 루프의 베타-턴, DE 루프 또는 GH 루프에 해당되는 아미노산 잔기인 것을 특징으로 하는 재조합 단백질을 제조하는 방법.

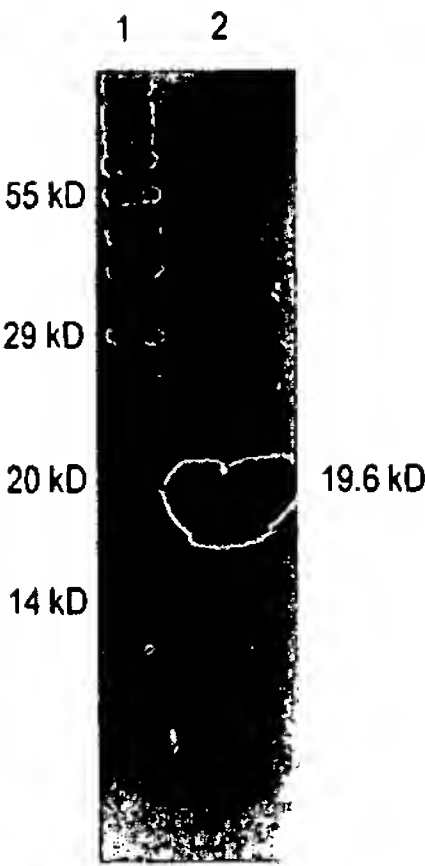
도면

도면1

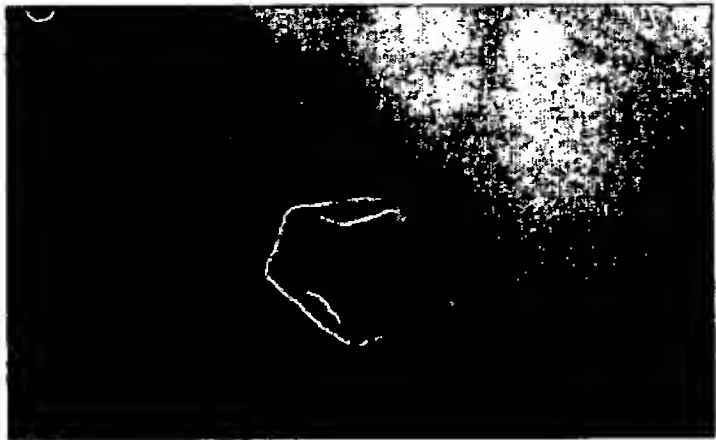


도면2

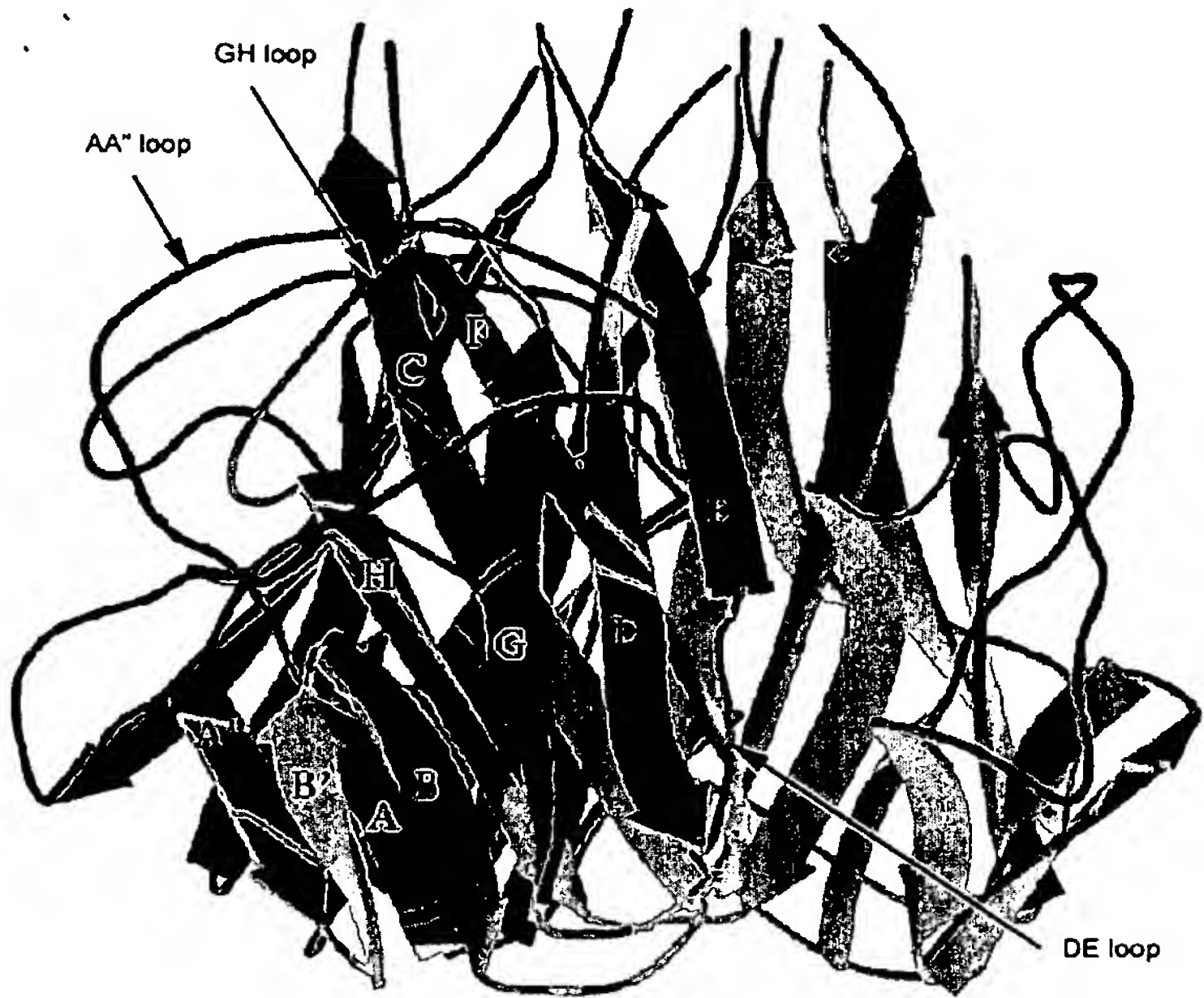




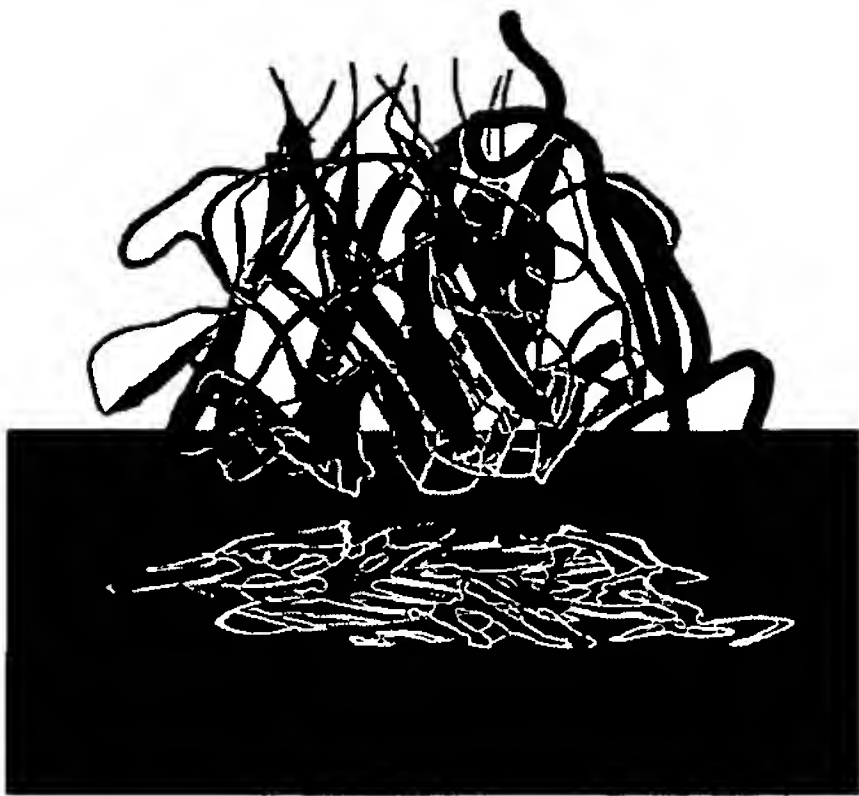
도면3



도면4



도면5



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ ~~FADED~~ TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**